

# TaqMan<sup>®</sup> Roundup Ready Quantification Kit

Part No: 4466335

## 1. Introducción

Los organismos modificados genéticamente (OMG) se encuentran ampliamente distribuidos, siendo la soja y el maíz los vegetales que ocupan mayor extensión de cultivo a nivel mundial. La cantidad de soja transgénica Roundup Ready constituye, aproximadamente el 77% de la soja cultivada a nivel mundial. Es el evento transgénico más extendido y el que genera una mayor problemática.

La Unión Europea ha establecido un marco legal que regula el empleo, la liberación al medio ambiente y sobre todo, el etiquetado de los productos alimenticios que contienen organismos modificados genéticamente.

El **TaqMan® Roundup Ready Quantification Kit**, permite determinar el porcentaje de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en una muestra.

Este kit emplea tecnología Real-Time PCR y contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la cuantificación de la soja Roundup Ready en ADN obtenido a partir de cualquier alimento o pienso. Además, el kit contiene ADN plasmídico que se emplea como estándar frente al que comparar las muestras con el objetivo de determinar el porcentaje de soja Roundup Ready.

## 2. Descripción del kit

El TaqMan® Roundup Ready Quantification Kit permite determinar el porcentaje de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en una muestra.

El análisis de cada muestra incluye dos reacciones de PCR a tiempo real. Una de ellas permite cuantificar la cantidad de soja total presente en la muestra y la otra reacción permite determinar la cantidad de soja Roundup Ready que contiene la muestra.

### **Reacción para determinar la cantidad de Soja total:**

Esta reacción incluye dos cebadores y una sonda tipo TaqMan® marcada con el fluoróforo FAM. La reacción permite amplificar de forma específica un gen endógeno de la soja, denominado lectina.

### **Reacción para determinar la cantidad de Soja Roundup Ready**

Esta reacción incluye dos cebadores y una sonda tipo TaqMan® marcada con el fluoróforo FAM. La reacción permite amplificar de forma específica el evento transgénico GTS-40-3-2 de la soja Roundup Ready. Este fragmento es específico de evento, es decir, amplifica la zona de unión del genoma de la soja con la construcción introducida en la soja Roundup Ready.

El kit incluye un estándar que consiste en ADN plasmídico con una copia de cada una de las dianas empleadas en el análisis. La comparación del resultado obtenido a partir de las muestras con este estándar, permite llevar a cabo la cuantificación relativa y obtener así el porcentaje de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en cada muestra.

## **Límites de detección y cuantificación**

Límite de cuantificación: 20 copias de ADN

Límite de detección de la PCR (sistema soja): 3 copias de ADN

Límite de detección de la PCR (sistema soja Roundup Ready): 3 copias de ADN

Este kit permite realizar cuantificaciones relativas de hasta el 0,01% de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en una muestra. El límite de cuantificación relativo, varía en función de la muestra analiza.

### 3. Componentes y almacenamiento del kit

Este kit contiene los reactivos necesarios para la realización de 48 reacciones de cada una de las regiones analizadas (ver apartado anterior):

| Reactivos          | Identificación | Cantidad   | Conservación |
|--------------------|----------------|------------|--------------|
| Master Mix RR soya | Disco verde    | 396 µl     | -20°C        |
| Master Mix Soya    | Disco morado   | 396 µl     | -20°C        |
| Master Mix General | Disco blanco   | 2 x 660 µl | 4°C          |
| Estándar RR soya   | Tapón verde    | 6 x 50 µl  | -20°C        |

### 4. Equipamiento necesario

La siguiente tabla muestra el equipamiento necesario para utilizar el TaqMan® Roundup Ready Quantification Kit:

| Listado de Equipamiento |                                                                                    |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                       | Termociclador Real-time PCR con canal de detección para el fluoróforo FAM (520 nm) |
| 2                       | Juego de micropipetas (10, 20 y 200 µl)                                            |
| 3                       | Centrífuga de sobremesa con adaptadores para placas de 96 y/o tubos                |
| 4                       | Vórtex                                                                             |

## 5. Material fungible necesario

La siguiente tabla muestra el material fungible necesario para utilizar el TaqMan® Roundup Ready Quantification Kit:

| Listdo de Material |                                                                                      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                  | Placas de PCR ópticas aptas para el termociclador empleado o tubos ópticos de 0,2 ml |
| 2                  | Films ópticos para cubrir las placas de PCR o tapas ópticas para los tubos empleados |
| 3                  | Puntas con filtro desechables para micropipetas                                      |
| 4                  | Tubos estériles de 1,5 ml                                                            |
| 5                  | Guantes de látex sin talco                                                           |

## 6. Preparación de las reacciones de amplificación

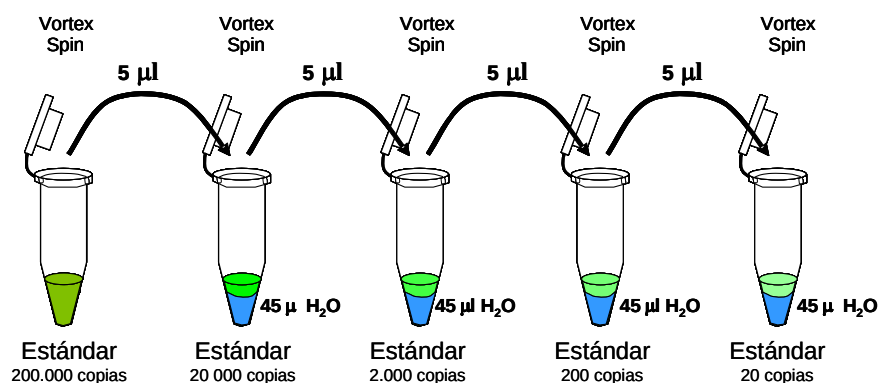
Para llevar a cabo la cuantificación relativa de soja Roundup Ready presente en una muestra, se llevan a cabo dos cuantificaciones absolutas. Por una parte se determina la cantidad de soja total presente en la muestra, y por otra parte determinaremos la cantidad de soja Roundup Ready. La preparación de las reacciones de amplificación incluye:

- Diluciones del estándar.
- Controles negativos de PCR y/o extracción.
- Análisis de las muestras por duplicado.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se tendrá en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

Se prepararán 2 masters de PCR distintos, uno para la soja y otro para la soja Roundup Ready. A continuación, se muestra el protocolo recomendado para la preparación de las reacciones de amplificación:

1. Descongelar un vial del estándar RR soja y preparar 4 diluciones seriadas 1:10 del estándar. De este modo obtendremos los patrones cuantitativos frente a los que comparar las muestras.



2. Descongelar los Master Mix, los controles negativos y los ADNs de las muestras (en caso de que se conserven congelados).
3. Dar un vórtex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
4. En un tubo de 1,5 ml, añadir 7,5 µl del Master Mix Soja por cada una de las reacciones.

5. En otro tubo de 1,5 ml, añadir 7,5 µl del Master Mix RR soja por cada una de las reacciones.
6. Añadir por cada reacción 12,5 µl del Master Mix General a cada una de los tubos anteriores. Dar un vórtex y pipetear 20 µl en cada pocillo o tubo.
7. Añadir 5 µl del ADN (10-25 ng/µl) de las muestras en los pocillos correspondientes.
8. Añadir 5 µl de cada dilución del Estándar y de los controles negativos en los pocillos correspondientes.
9. Tapar la placa con film óptico y dar un spin.

|   | 1 | 2                    | 3             | 4 | 5                  | 6           | 7 | 8 |
|---|---|----------------------|---------------|---|--------------------|-------------|---|---|
| A |   |                      |               |   |                    |             |   |   |
| B |   | <b>S</b> Soja<br>2E5 | <b>U</b> Soja |   | <b>S</b> RR<br>2E5 | <b>U</b> RR |   |   |
| C |   | <b>S</b> Soja<br>2E4 | <b>U</b> Soja |   | <b>S</b> RR<br>2E4 | <b>U</b> RR |   |   |
| D |   | <b>S</b> Soja<br>2E3 | <b>U</b> Soja |   | <b>S</b> RR<br>2E3 | <b>U</b> RR |   |   |
| E |   | <b>S</b> Soja<br>200 | <b>U</b> Soja |   | <b>S</b> RR<br>200 | <b>U</b> RR |   |   |
| F |   | <b>S</b> Soja<br>20  | <b>N</b> Soja |   | <b>S</b> RR<br>20  | <b>N</b> RR |   |   |

## 7. Programa de amplificación

Someter las reacciones de amplificación al siguiente programa de amplificación:

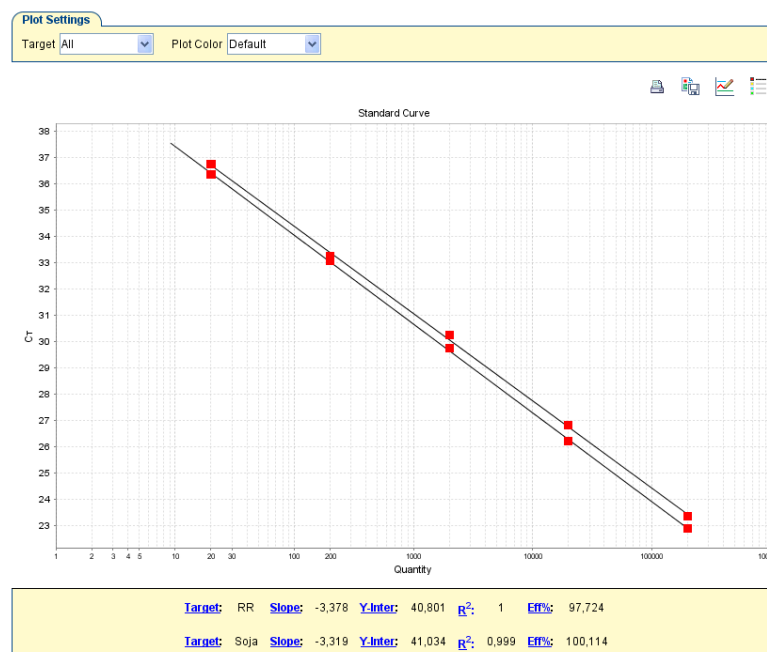
| Temperatura | Tiempo      | Ciclos |
|-------------|-------------|--------|
| 95°C        | 10 minutos  | 1      |
| 95°C        | 15 segundos | 50     |
| 60°C        | 1 minuto    |        |

*Nota: Este programa ha sido validado en un equipo StepOne Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Si se emplea en otra marca o modelo de termociclador, es posible que se deba ajustar el programa de amplificación. Póngase en contacto con nuestro servicio técnico si necesita recibir asesoramiento.*

## 8. Análisis de los resultados

Antes de analizar los resultados de las muestras, se comprobará que el resultado obtenido a partir de los diferentes controles es el esperado:

- **Controles negativos:** No se debe detectar amplificación ni en la reacción correspondiente a soja ni en la reacción correspondiente a soja Roundup Ready. La amplificación en un control negativo indicaría la presencia de contaminación, lo que conllevaría la repetición del ensayo.
- **Estándar RR soja:** Se debe detectar amplificación en los cinco puntos del estándar de soja y en los cinco puntos correspondientes a la soja Roundup Ready. Además, las rectas obtenidas a partir de los distintos puntos del estándar deben cumplir los siguientes requisitos:
  - o La eficiencia de la recta debe tener un valor comprendido entre 90% y 105%
  - o La pendiente de la recta debe tener un valor comprendido entre -3,1 y -3,9
  - o El coeficiente de correlación ( $R^2$ ) debe tener un valor superior a 0,98



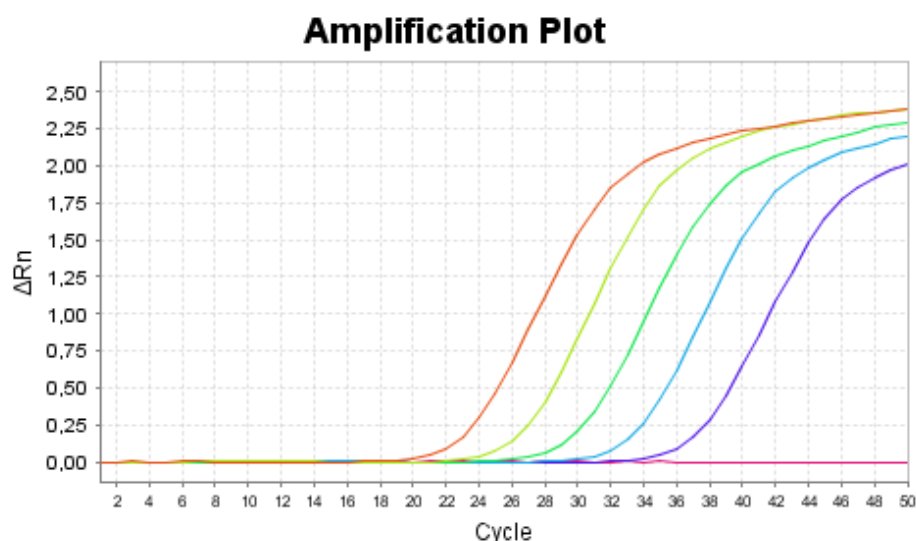
Una vez verificados los controles se analizan los resultados obtenidos a partir de las muestras. En el caso de que se hayan realizado duplicados, los resultados de ambas réplicas deben ser similares.

Para cada reacción de amplificación hay tres posibles resultados, tanto para las reacciones de soja como para las de soja Roundup Ready:

- **No detectado:** No hay amplificación en la muestra. La curva de amplificación es plana.
- **No cuantificable:** Se detecta amplificación en la muestra pero en una cantidad inferior al último punto de la recta. Cuando el Ct de la muestra es mayor que el Ct del estándar de 20 copias, se puede concluir que existe la presencia del analito pero la cantidad no es cuantificable.
- **Cuantificable:** Se detecta amplificación en la muestra en una cantidad superior al último punto de la recta. Cuando el Ct de amplificación de la muestra está interpolado entre los valores de los puntos del estándar el resultado cuantitativo es fiable y se puede emplear para calcular el porcentaje de soja Roundup Ready.

Para el cálculo del porcentaje de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en una muestra se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Soja RR} = \frac{\text{Nº de copias soja RR} \times 100}{\text{Nº de copias soja}}$$



En la siguiente tabla se representan gráficamente los resultados que se pueden obtener a partir del análisis de una muestra, así como la interpretación que se debe hacer a partir del resultado obtenido:

| <b>Soja</b>      | <b>Soja RR</b>   | <b>INTERPRETACIÓN</b>                                                                                                                                    |
|------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cuantificable    | No detectado     | No se ha detectado la presencia de soja Roundup Ready en la muestra.                                                                                     |
| Cuantificable    | No cuantificable | La cantidad de soja Roundup Ready detectada en la muestra es inferior al límite de cuantificación.                                                       |
| Cuantificable    | Cuantificable    | La cantidad de soja Roundup Ready respecto a la soja total presente en la muestra es de X%                                                               |
| No cuantificable | No detectado     | No se ha detectado la presencia de soja Roundup Ready en la muestra, la cantidad de soja presente en la muestra es inferior al límite de cuantificación. |
| No cuantificable | No cuantificable | Las cantidades de soja y soja Roundup Ready detectadas en la muestra son inferiores al límite de cuantificación.                                         |
| No detectado     | No detectado     | No se ha detectado la presencia de soja ni la presencia de soja Roundup Ready en la muestra.*                                                            |

\* Es posible que el hecho de no detectar ADN de soja en una muestra, sea debido a la presencia de inhibidores en el ADN empleado. Para verificar la ausencia de inhibidores en la muestra, le aconsejamos que emplee un control de inhibición consistente en una amplificación con el Master Mix de Soja en un pocillo donde se han mezclado, el ADN de la muestra problema con 1 µl del control de inhibición que se corresponde con la dilución de 20.000 copias del estándar. Paralelamente, se amplifica otro pocillo con 5 µl de agua y 1 µl del mismo control de inhibición. Si la amplificación de ambas reacciones es similar, se puede concluir que la muestra no está inhibida.

## 9. Control de calidad

Todos los productos comercializados por el Instituto de Medicina Genómica son sometidos a un riguroso control de calidad. El **TaqMan® Roundup Ready Quantification Kit** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

Puede consultar el Certificado de Análisis correspondiente a su kit, introduciendo el número de lote del producto en la sección de Kits de Análisis de la web [www.imegen.es](http://www.imegen.es).

## 10. Garantías y responsabilidades

El Instituto de Medicina Genómica le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de su fabricación. Esta garantía se hace extensible a un período de un año desde la fecha de envío del producto, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este Manual. **Nuestros productos están diseñados para uso en investigación.** El usuario de los productos es responsable de validar la utilidad de los protocolo propuestos por el Instituto de Medicina Genómica. Dichos protocolos se consideran únicamente una guía. El Instituto de Medicina Genómica no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este set. La única obligación del Instituto de Medicina Genómica, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. El Instituto de Medicina Genómica no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

## 13. Servicio de atención al cliente

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

**Teléfono:** 963 212 340

**Mail:** [info@imegen.es](mailto:info@imegen.es)

